

УДК: 575.222.73:577.2
DOI 10.37555/2707-3114.1.2021.247730

Характеристика кариотипа и плазмоти́па у пшенично-ржаных гибридов с различной структурной организацией ядерного генома

Сычева Е. А., Соколюк А. В., Василевская М. Е., Соловей Л. А., Бондаревич Е. Б., Люсиков О. М., Дубовец Н. И.
Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: E. Sycheva@igc.by

Karyotype and plasmotype characteristics in wheat-rye hybrids with the different structural organization of the nuclear genome

Sycheva E. A., Sokoluk A. V., Vasilevskaya M. E., Solovey L. A., Bondarevich E. B., Lyusikov O. M., Dubovets N. I.
Institute of Genetics and Cytology, NAS of Belarus, Republic of Belarus, Minsk, 27 Akademicheskaya St., e-mail: E. Sycheva@igc.by

Характеристика каріотипу і плазмотипу у пшенично-житніх гібридів з різною структурною організацією ядерного генома

Сичова Е. А., Соколюк А. В., Василевська М. Є., Соловей Л. А., Бондаревич Є. Б., Люсиков О. М., Дубовець Н. І.
Інститут генетики і цитології НАН Білорусі, Республіка Білорусь, м. Мінськ, вул. Академічна, 27, e-mail: E. Sycheva@igc.by

Аннотация. Цель. Анализ геномной структуры и идентификация плазмоти́па у пшенично-ржаных гибридов различного типа (тритикале, секалотритикум) и уровня пloidности. **Методы.** Цитологический и молекулярно-генетический анализ. **Результаты.** Проведен анализ кариотипа и плазмоти́па у 11 стабильных линий вторичных рекомбинантных гексаплоидных тритикале с интрогрессией хромосом D-генома пшеницы (A/B/DRR, $2n=6x=42$), 14 стабильных высокопродуктивных линий секалотритикум F_{6-16} поколений (Secalotriticum, S^1 /RRAABB, $2n=6x=42$), 9 стабильных линий тетраплоидных тритикале (A/BRR, $2n=4x=28$). С помощью дифференциального окрашивания хромосом охарактеризован хромосомный состав экспериментального материала, выявлены межгеномные замещения и транслокации хромосом. ПЦР-ПДРФ-анализ 18S/5S митохондриального (mt) повтора и ndhH-района хлоропластной ДНК показал, что эти районы органелльных ДНК находятся в гомоплазматическом состоянии и относятся к ржаному типу у линий секалотритикум и пшеничному типу у линий тетраплоидных и вторичных рекомбинантных гексаплоидных тритикале. **Выводы.** В ходе цитологического и молекулярно-генетического анализа выявлено значительное генетическое разнообразие созданного генофонда пшенично-ржаных гибридов по ядерно-цитоплазматической структуре. Синтезированный линейный материал пшенично-ржаных гибридов может быть использован в цитогенетических исследованиях и практической селекции.

Ключевые слова: пшенично-ржаные гибриды, хромосомно-замещенные линии, кариотип, плазмотип, C-бэндинг, ДНК-маркеры.

Abstract. Aim. Genome structure analysis and plasmotype identification in wheat-rye hybrids of various types (triticale, secalotriticum) and ploidy level. **Methods.** Cytological and molecular-genetic analysis. **Results.** The karyotype and plasmotype analysis was carried out in 11 stable lines of secondary recombinant hexaploid triticale with the introgression of D-genome chromosomes of the wheat (A/B/DRR, $2n = 6x = 42$), 14 stable and highly productive secalotriticum lines of F_{6-16} generations (Secalotriticum, S^1 /RRAABB, $2n = 6x = 42$), 9 stable lines of tetraploid triticale (A/BRR, $2n = 4x = 28$). By means of differential chromosome staining, the chromosomal composition of the experimental material was characterized and the intergenomic substitution and translocation of chromosomes were detected. The PCR-RFLP analysis of the 18S/5S mitochondrial (mt) repeat and the ndhH-region of chloroplast DNA showed that these organelle DNA regions are in the homoplasmic state and belong to rye-type cytoplasm in secalotriticum lines and wheat-type

cytoplasm in tetraploid and secondary recombinant hexaploid triticale lines. **Conclusions.** Cytological and molecular genetic analysis revealed significant genetic diversity of the created gene pool of wheat-rye hybrids by nuclear-cytoplasmic structure. The synthesized linear material of wheat-rye hybrids may be used in cytogenetic research and practical breeding.

Keywords: wheat-rye hybrids, chromosome substitution lines, karyotype, plasmotype, C-banding, genetic markers.

Анотація. Мета. Аналіз геномної структури і ідентифікація плазмотику у пшенично-житніх гібридів різного типу (тритикале, секалотритікум) і рівня плідності. **Методи.** Цитологічний і молекулярно-генетичний аналіз. **Результати.** Проведено аналіз каріотипу та плазмотику у 11 стабільних ліній вторинних рекомбінантних гексаплоїдних тритикале з інтрогресією хромосом D-геному пшениці (A/B/DRR, $2n = 6x = 42$), 14 стабільних високопродуктивних ліній секалотритікум F_{6-16} поколінь (Secalotriticum, $S/RRAABB$, $2n = 6x = 42$), 9 стабільних ліній тетраплоїдних тритикале (A/BRR, $2n = 4x = 28$). За допомогою диференціального фарбування хромосом охарактеризований хромосомний склад експериментального матеріалу, виявлені міжгеномні заміщення і транслокації хромосом. ПЛР-ПДРФ-аналіз 18S/5S мітохондріального (mt) повтору і ndhH-району хлоропластної ДНК показав, що ці райони органелльних ДНК знаходяться в гомоплазматичному стані і відносяться до житнього типу у ліній секалотритікум і пшеничному типу у ліній тетраплоїдних і вторинних рекомбінантних гексаплоїдних тритикале. Висновки. В ході цитологічного і молекулярно-генетичного аналізу виявлено значну генетичну різноманітність створеного генофонду пшенично-житніх гібридів по ядерно-цитоплазматичній структурі. Синтезований лінійний матеріал пшенично-житніх гібридів може бути використаний в цитогенетичних дослідженнях і практичній селекції.

Ключові слова: пшенично-житні гібриди, хромосомно-заміщені лінії, каріотип, плазмотип, C-бендінг, ДНК-маркери

Введение. Синтетические амфидиплоидные гибриды пшеницы с рожью (\times Triticale) являются одним из примеров наиболее успешного применения отдаленной гибридизации и экспериментальной полиплоидии в селекции зерновых культур. Современный генофонд пшенично-ржаных гибридов представлен искусственным полиплоидным рядом: тетра-, гекса- и октоплоиды, а также включает хромосомно-замещенные формы, в том числе с генетическим материалом диких видов злаков (Гордей и др., 2020). На сегодняшний день из них лишь гексаплоидные тритикале (*Triticosecale hexaploidii (derzhavinii)* Kurk. et Filat.; AABBR, $2n=6x=42$) в наиболее полной мере отвечают требованиям сельскохозяйственного производства. В целом менее урожайные тетраплоидные (*Triticosecale tetraploidii (lebedevii)* Kurk.; A/BRR, $2n=4x=28$) и октоплоидные (*Triticosecale rimpaui* Wittm.; AABDDR, $2n=8x=56$) формы используются в основном в работах по хромосомной реконструкции полигенома тритикале. Дальнейший прогресс в селекции культуры связывают с необходимостью расширения её генофонда за счет вовлечения в скрещивания видового и сортового разнообразия пшеницы и ржи, создания новых амфидиплоидов различного геномного состава и ядерно-цитоплазматической структуры (на цитоплазме пшеницы или ржи).

В Институте генетики и цитологии НАН Беларуси создан разнообразный генофонд пшенично-ржаных гибридов. Коллекция включает линии вторичных рекомбинантных гексаплоидных тритикале (ВРЛ) с интрогрессией хромосом D-генома пшеницы; линии тетраплоидных пшенично-ржаных гибридов с различным составом пшеничного компонента каріотипа и ржано-пшеничные амфидиплоиды (*Secalotriticum*, $S/RRAABB$, $2n=6x=42$).

В сообщении представлены результаты изучения геномной структуры и идентификации плазмотику у пшенично-ржаных гибридов различного типа (тритикале, секалотритікум) и уровня плідності.

Материалы и методы. Объектами исследования служили:

- 11 стабільних ліній вторичних рекомбінантних гексаплоїдних тритикале з інтрогресією хромосом D-генома пшениці (A/B/DRR, $2n=6x=42$), отриманих шляхом гібридизації первичних рекомбінантних ліній з сучасними сортами тритикале (Дубовець і др., 2013);
- 14 стабільних високопродуктивних ліній секалотритікум F_{6-16} поколінь (*Secalotriticum*, $S/RRAABB$, $2n=6x=42$), отриманих в результаті гібридизації тетраплоїдної ржи з гексаплоїдними тритикале і наступуючого однократного беккроса на тритикале отриманих пентаплоїдних ржано-тритикальних гібридів F_1 (Гордей, Люсіков і Гордей, 2020);

– 9 стабильных линий тетраплоидных тритикале (A/BRR, $2n=4x=28$), выделенных в потомстве от скрещивания гексаплоидных тритикале с диплоидной рожью (Дубовец и др., 2010);

Для определения геномной структуры экспериментального материала был использован вариант метода дифференциального окрашивания хромосом по Гимза (С-бэндинг), разработанный в Институте молекулярной биологии РАН (Badaeva, 1984). Анализ препаратов проводили на микроскопе Ампливал (Карл Цейс, Йена) с объективом Апохромат 100×, апертура 1,32 МИ. Идентификация индивидуальных хромосом А-, В-, D- и R-геномов осуществлялась согласно обобщенной видовой идиограмме дифференциально окрашенных хромосом (Sozinova et al., 1990). Отобранные метафазные пластинки фотографировали с помощью цифровой видеокамеры LeicaDC300. Обработку полученных изображений проводили с использованием графического редактора AdobePhotoshop CC 2017.

Выделение тотальной ДНК осуществлялось с помощью набора Thermo Scientific GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit. Изучение тотальной ДНК проводилось с помощью ПЦР со специфическими праймерами к 18S/5S митохондриальному (мт) повтору и *ndhH*-району хлоропластной (хп) ДНК. ПЦР проводилась в смеси следующего состава: 250 мкМ каждого из dNTP; 1 мкМ каждого праймера, 2мМ MgCl₂, 1U TaqДНК-полимеразы (ArtBioTech), 1xPCR буфер (ArtBioTech), 100–200 нг тотальной ДНК с использованием амплификатора Bio-Rad C1000 Touch Thermal Cycler.

Для амплификации 18S/5S мт-повтора были использованы прямой праймер с нуклеотидной последовательностью — 5'-TTCTCGCGTTCSSCTTAATTC-3'; обратный праймер с нуклеотидной последовательностью — 5'-CGTTCGCCACTTTGTTCTCA-3'. Оптимальными условиями для проведения амплификации являются: первичная денатурация — 5 мин при 94 °С; 35 циклов: денатурация — 92 °С, 30 сек; отжиг — 55 °С, 1 мин; элонгация — 72 °С, 1 мин; заключительная достройка — 72 °С, 10 мин.

Для амплификации *ndhH*-района хпДНК были использованы следующие праймеры: прямой — 5'-tgcatgggtgtcttcgactg-3'; обратный — 5'-ggattccctcattccaccaac-3'. Оптимальными условиями для проведения амплификации являются: первичная денатурация — 5 мин при 94 °С; 35 циклов: денатурация — 94 °С, 45 сек; отжиг — 60 °С, 1 мин; элонгация — 72 °С, 1 мин; заключительная достройка — 72 °С, 10 мин.

Детекция принадлежности локусов органелльной ДНК к пшеничному или ржаному типу проводилась с помощью рестрикционного анализа ПЦР-продуктов: 18S/5S мт-повтор анализировался с использованием эндонуклеазы рестрикции *Sal I*, *ndhH*-район хлоропластной ДНК анализировался с использованием эндонуклеазы рестрикции *Msp I*.

Продукты ПЦР и рестрикции фракционировали методом горизонтального электрофореза в 1,5% агарозном геле в 1×ТАЕ буфере в течение 90 минут при напряжении 80В. Результат документировался в системе геле документации Biorad Gel Doc XR+.

Результаты и обсуждение. Анализ геномной структуры пшенично-ржаных гибридов. Проведение исследований с использованием отдаленных гибридов и рекомбинантных форм обуславливает необходимость анализа геномной структуры экспериментального материала.

Идентификация хромосомного состава включенных в исследование вторичных рекомбинантных линий гексаплоидных тритикале (ВРЛ) показала, что ВРЛ характеризуются стабильным одновариантным кариотипом с интрогрессией хромосом D-генома пшеницы в виде D(A)- и D(B)-замещений в различных гомеологичных группах в дисомном состоянии. В кариотипах исследованных линий содержится от 1 до 3 пар хромосом D-генома, замещения затрагивают 1, 2, 3 и 6 гомеологичные группы (таблица 1, рис. 1, 2). Ржаной компонент кариотипа у всех линий был представлен диплоидным набором хромосом без замещений и хромосомных aberrаций.

Таблица 1. Типы межгеномных замещений хромосом у вторичных рекомбинантных линий гексаплоидных тритикале

Линия	Типы межгеномных замещений хромосом
ВРЛ-1	1D(1A), 2D(2B)
ВРЛ-2	1D(1A), 6D(6B)

1	2
ВРЛ-3	2D(2B), 3D(3A)
ВРЛ-4	3D(3A)
ВРЛ-5	1D(1A)
ВРЛ-7	1D(1A), 3D(3A)
ВРЛ-8	1D(1A), 2D(2B)
ВРЛ-9	1D(1A), 2D(2B), 3D(3A)
ВРЛ-10	3D(3A)
ВРЛ-11	1D(1A), 2D(2B), 6D(6B)
ВРЛ-12	2D(2B)

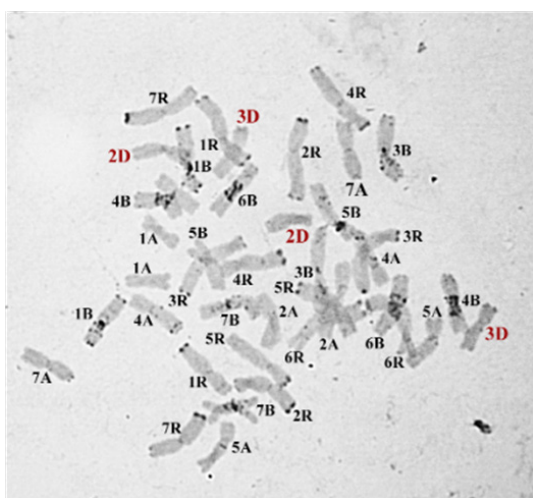


Рис. 1. Кариотип линии гексаплоидных тритикале ВРЛ –3

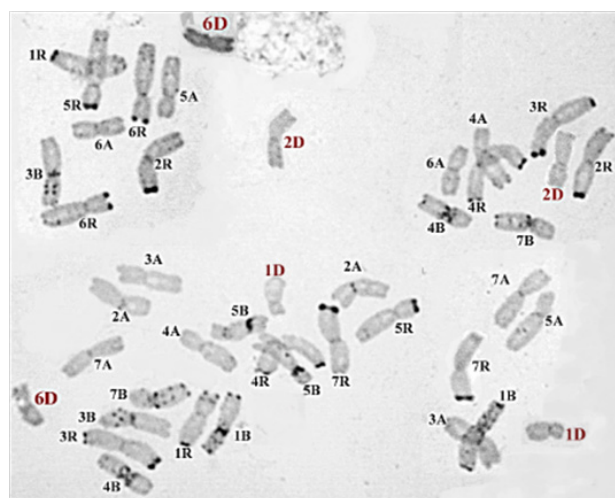


Рис. 2. Кариотип линии гексаплоидных тритикале ВРЛ –11

В отличие от ВРЛ образцы секалотритикум характеризуются наличием полнокомплектных А- и В-геномов пшеницы и R-генома ржи.

Результаты хромосомного анализа линий тетраплоидных тритикале представлены в таблице 2. Поскольку все линии имеют полный набор хромосом ржи, таблица содержит описание только пшеничного компонента кариотипа.

Таблица 2. Хромосомный состав пшеничного компонента кариотипа у линий тетраплоидных тритикале

Линия	Хромосомный состав гомеологичных групп						
	1	2	3	4	5	6	7
ПРАТ 16(10)	AA	ВТВТ	AA	AA	AA	AA	BB
ПРАТ 69(2)	ВТВТ	АТАГ	АТАГ	AA	AA	AA	AA
ПРАТ 72(4)	AA	ВТВТ	AA	AA	AA	AA	BB
ПРАТ 72(7/1)	AA	ВТВТ	AA	AA	AA	AA	BB
ПРАТ 72(7/4)	AA	ВТВТ	AA	AA	AA	AA	BB
ПРАТ 196(3)	ВТВТ	AA	AA	AA	AA	AA	ВТВТ
ПРАТ196(4)	AA	АТАГ	AA	AA	AA	AA	BB
ПРАТ 245(1)	AA	AA	АТАГ	AA	AA	AA	BB
ПРАТ 289	AA	AA	AA	AA	AA	AA	BB

Г — обозначает транслоцированную хромосому

Как видно из данных таблицы 2, тетраплоидные пшенично-ржаные гибриды характеризуются стабильным кариотипом, когда все гомеологичные группы пшеничного компонента представлены парами гомологов А- и В-геномов. Различия в хромосомном составе между исследованными линиями обусловлены разными сочетаниями хромосом в 1, 2, 3 и 7-ой гомеологичных группах пшеничного компонента, в то время как 4, 5 и 6-ая группы содержат хромосомы только А-генома пшеницы. 8 линий тетраплоидных тритикале несут рекомбинантные хромосомы, образовавшиеся в результате кроссоверных обменов между гомеологами А- и В-геномов пшеницы. Наличие транслоцированных хромосом отмечено в 1, 2, 3 и 7-ой гомеологичных группах. Максимальное количество транслоцированных хромосом характерно для линии ПРАТ 69(2) (рис. 3).

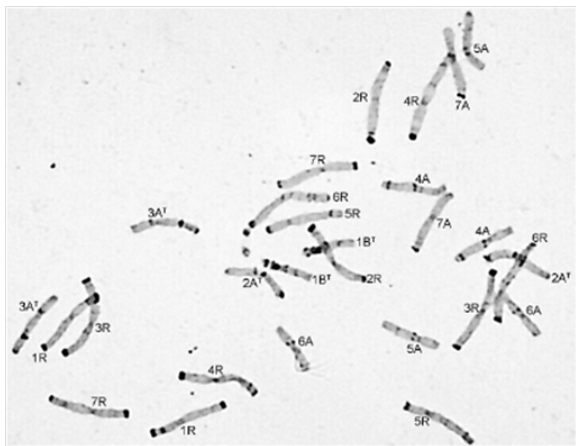


Рис. 3. Кариотип линии тетраплоидных тритикале ПРАТ 69(2) с парами рекомбинантных хромосом 1BS.1BL-1AL, 2BS-2AS, 2AL, 3AS.3AL-3BL

Анализ плазмотида у пшенично-ржаных гибридов

Из литературных данных известно, что в зависимости от происхождения пшенично-ржаные гибриды могут содержать различные родительские типы митохондриальной (мт) и хлоропластной (хп) ДНК, при этом в некоторых случаях наблюдается явление гетероплазмии, когда у одного растения присутствуют более одного варианта хпДНК и/или мтДНК (Трубачева и др., 2012). Установлено, что гетероплазмия у гибридных форм может затрагивать одновременно несколько локусов органелльной ДНК и сохраняться в ряду самоопыленных поколений (Hattori et al., 2002).

Детектировать различия между органелльной ДНК пшеницы и ржи можно на основании ПЦР-ПДФА анализа *ndhH*-района хлоропластной ДНК (имеет сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции *MspI*) и 18S/5S-повтора митохондриальной ДНК (имеет сайт узнавания эндонуклеазы *Sall*). Плазмотипу ржи соответствует отсутствие рестрикции амплифицированного участка *ndhH* эндонуклеазой *MspI* (фрагмент 750 п.н.) и наличие рестрикции *tMet*-18S/5S-локуса эндонуклеазой *Sall* (фрагменты 250 п.н.), а плазмотипу пшеницы — рестрикция амплифицированного участка *ndhH* эндонуклеазой *MspI* (фрагменты длиной 500 и 250 п.н.) и отсутствие рестрикции *tMet*-18S/5S-локуса эндонуклеазой *Sall* (фрагмент 500 п.н.).

В результате рестрикционного анализа у всех исследованных линий вторичных рекомбинантных гексаплоидных тритикале по *ndhH*-району хпДНК были получены фрагменты длиной 500 и 250 п.н. (рис. 4), по 18S/5S мт-повтору — 500 п.н. (рис. 5), что позволяет отнести их к пшеничному типу. Аналогичные результаты получены для тетраплоидных тритикале.

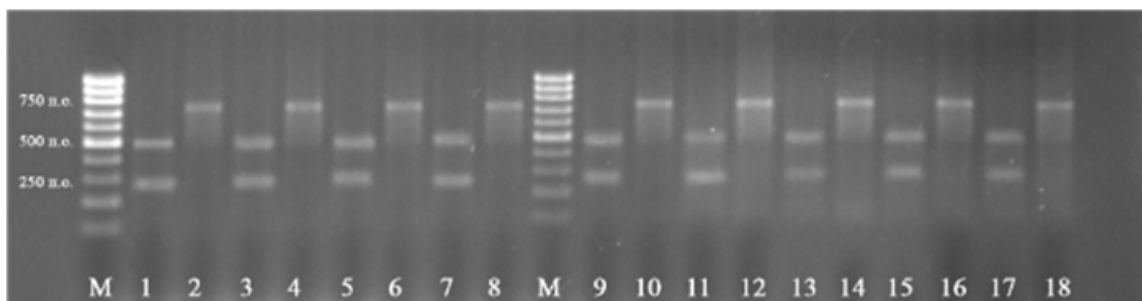


Рис. 4. Электрофореграмма детекции ПЦР-продуктов и продуктов рестрикции ПЦР-продуктов вторичных рекомбинантных гексаплоидных тритикале. М — Маркер молекулярного веса (100 bp DNA Ladder) 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 — ПЦР-продукт *ndhH*-района; 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 — результат рестрикции ПЦР-продукта *ndhH*-района.

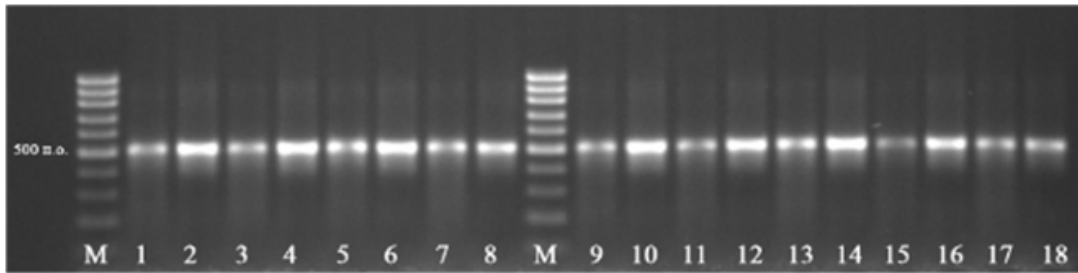


Рис. 5. Электрофореграмма детекции ПЦР-продуктов и продуктов рестрикции ПЦР-продуктов вторичных рекомбинантных гексаплоидных тритикале. М–Маркер молекулярного веса (100 bp DNA Ladder) 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17– ПРЦ-продукт 18S/5S мт-повтора; 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 – результат рестрикции ПРЦ-продукта 18S/5S мт-повтора.

У всех исследованных линий секалотритикум по *ndhH*-району хлоропластной ДНК были получены фрагменты длиной 750 п.н. (рис. 6), по 18S/5S-повтору митохондриальной ДНК – 250 п.н. (рис. 7). Это свидетельствует о принадлежности данных районов к ржаному типу.

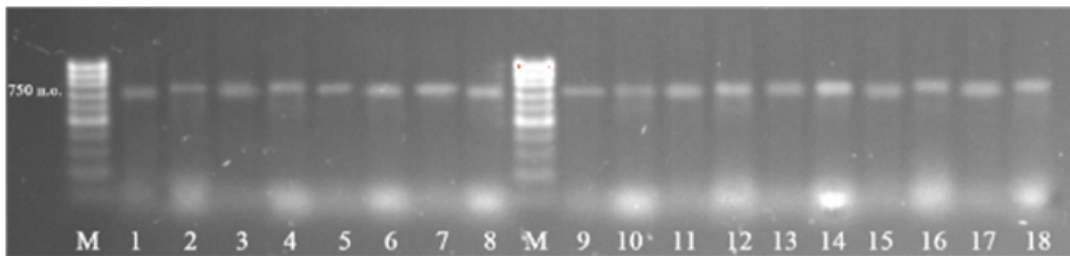


Рис. 6. Электрофореграмма детекции ПЦР-продуктов и продуктов рестрикции ПЦР-продуктов линий секалотритикум. М–Маркер молекулярного веса (100 bp DNA Ladder) 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 – ПРЦ-продукт *ndhH*-района; 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 – результат рестрикции ПРЦ-продукта *ndhH*-района.

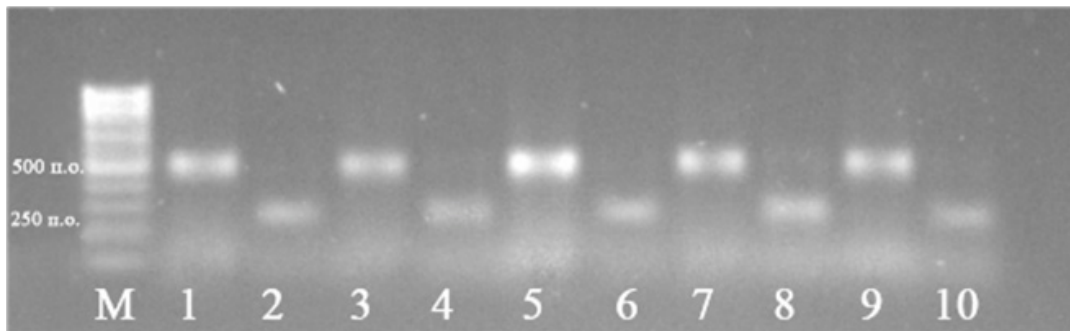


Рис. 7. Электрофореграмма детекции ПЦР-продуктов и продуктов рестрикции ПЦР-продуктов линий секалотритикум. М–Маркер молекулярного веса (100 bp DNA Ladder) 1, 3, 5, 7, 9 – ПРЦ-продукт 18S/5S мт-повтора; 2, 4, 6, 8, 10. – результат рестрикции ПРЦ-продукта 18S/5S мт-повтора.

Выводы. В ходе цитологического и молекулярно-генетического анализа показано значительное генетическое разнообразие созданного генофонда пшенично-ржаных гибридов, включая наличие у них межгеномных замещений и транслокаций хромосом. Полученные результаты позволили идентифицировать районы органелльных ДНК ржаного типа в гомоплазматическом состоянии у линий секалотритикум и пшеничного типа в гомоплазматическом состоянии у линий тетраплоидных и вторичных рекомбинантных гексаплоидных тритикале. Гетероплазматического состояния исследованных локусов митохондриальной и хлоропластной ДНК выявлено не было. Созданный стабильный линейный материал пшенично-ржаных гибридов различной

ядерно-цитоплазматической структуры может быть использован в цитогенетических исследованиях и практической селекции.

Список использованных источников

Гордей, И.А., Люсиков, О.М., Белько, Н.Б., Хотылева, Л.В., Каминская, Л.Н., Корень, Л.В., Орловская, О.А., Дубовец, Н.И., Сычева, Е.А. Соловей, Л.А., Бондаревич, Е.Б., Гриб, С.И., Буштевич, В.Н. (2020). Тритикале. *Генетические основы селекции растений. В 4 т. Т. 2. Частная генетика растений.* под ред. А. В. Кильчевский, Л. В. Хотылева; Нац. Акад. Наук Беларуси, Ин-т генетики и цитологии. 2-е издание, испр., перераб. и доп. Минск: Беларуская наука, 2020. С. 52–154.

Гордей, И.А., Люсиков, О.М., Гордей, И.С. (2020). *Технология создания ржано-пшеничных амфидиплоидов с цитоплазмой ржи — секалотритикум: методические рекомендации.* Минск: Право и экономика. 34 с.

Дубовец, Н.И., Сычева, Е.А., Соловей, Л.А., Штык, Т.И., Бондаревич, Е.Б. (2013). Создание и молекулярно-цитогенетическое маркирование вторичных хромосомно-замещенных форм гексаплоидных тритикале (*×triticosecale* Wittm.). *Весті НАН Беларусі. Сер. біял. навук.* 4. С. 35–44.

Дубовец, Н.И., Сычева, Е.А., Соловей, Л.А., Штык, Т.И., Бондаревич, Е.Б., Кабашникова, Л.Ф., Савченко, Г.Е. (2010). Создание генетической коллекции тетраплоидных пшенично-ржаных амфидиплоидов и её использование в цитогенетических исследованиях. *Сборник научных трудов Института генетики и цитологии НАН Беларуси «Молекулярная и прикладная генетика».* 11. С. 26–33.

Трубачеева, Н.В., Кравцова, Л.А., Девяткина, Э.П., Ефремова, Т.Т., Синявская, М.Г., Шумный, В.К., Першина, Л.А. (2012). Гетеро- и гомоплазматическое состояние районов митохондриальной и хлоропластной ДНК у потомков отдаленных гибридов мягкой пшеницы разного происхождения. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 16 (1). С. 160–169.

Badaeva, E.D. (1984). *Izmeneniye khromosom rzhiv kariotipe triticales [Changing the chromosomes of rye in a karyotype of triticales]: dis. ... kand. biol. nauk: 03.00.15.* Москва. 181 p.

Hattori, N., Kitagawa, K., Takumi, S., Nakamura, C. (2002). Mitochondrial DNA heteroplasmy in wheat, *Aegilops* and their nucleus cytoplasm hybrids. *Genetics.* 160 (4). P. 1619–1630.

Sozinova, L.F., Badaev, N.S., Muravenko, O.V., Zelenin, A.V. (1990). “Chromosomal passport” of *Triticum aestivum* L. em Thell. cv. Chinese Spring and standartization of chromosomal analysis of cereals. *Cereal Res. Commun.* 18 (4). P. 273–281.